This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

⑩日本国特計庁(JP)

母公表特許公報(A)

平4-502611

母公表 平成4年(1992)5月14日

@Int.CL 3 A 61 K

識別記号 ADU

厅内整理番号 8317-4C

審 査 請 求 未請求 子備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

(全 11 頁)

37/02 7/00 -

9051-4C 9051-4C × Ď

60発明の名称

コラーゲンの架構の抑制用化合物および抑制方法

頭、平1-510274 - (五)特

顧平1(1989)9月28日 **多数出**

段翻訳文提出日 平3(1991)3月28日 **匈国 際 出 願 PCT/AU89/00422**

匈国際公開番号 WO90/06102

@国際公開日 平2(1990)6月14日

優先権主張

@1988年9月28日@オーストラリア(AU)@PJ0675

√グリッグ**,** ジョフレイ・ウオル の発明 者

オーストラリア国 ニュー・サウス・ウエールズ 2066、レイン・

コーヴ、パーンズ・ペイ・ロード 352

ペプタイド・テクノロジー・リ 勿出 顕 人

9-

オーストラリア国 ニュー・サウス・ウエールズ 2099、ディー・

フアイ、インマン・ロード 4-10

ミテフド 弁理士 萩 野 平 外3名 四代理 人

和指定 国

AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特 許),I T(広域特許),J P,L U(広域特許),N L(広域特許),S E(広域特許),U S

最終頁に続く

讃求の難囲

1. 活性化合物と組合せた通切な観形剤を含む組成物で皮み を治療することを含んでなり、前記話性化合物がカルノシン、 ホモカルノシン、アンセリン、3ーメチルーLーヒスチジン、 **しーアラニルーモーチロシン、アシルホモカルノジン、アゼチ** ルカルノシン、ヨードカルノシン、ジョードカルプシン、硝酸 アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体および その組合せから選ばれることを特徴とする、皮本のコラーゲン の架模および/または皮ふ細胞のDNAに対する損傷を減少ま たは防止する方法。

- 2. 活性化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいは その組合せである請求の範囲第1項記載の方法。
- 3. 活性化合物がカルノシンである請求の範囲第2項記載の 方法。
- 4. 活性化合物がもう1つの分子と結合させられ、取分子は 組成物が皮よ浸透、皮よ適用および組織吸収に関して改善させ られるようなものである確求の範囲第1項~第3項のいずれか 1項に記載の方法。
- 5.分子がアミノ酸またはペプチドである辞求の範囲第4項 記載の方法。
- 6. 方法が皮ふへの組成物の局部適用を含む請求の範囲第1 現~第5項のいずれか1項記載の方法。
- 7. 組成物が、ビリルピン、カロテノイド、マンニトール、 選元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、 ビタミンBおよびその組合せから選ばれる化合物を含む請求の

範囲第1項~第6項のいずれか1項記載の方法。

- 8. 活性化合物と超合せた選切なは形列を含む組成物で皮を を治療することを含んでなり、前記話性化合物がカルノシン、 ホモカルノシン、アンセリン、3ーメチルー1ーヒスチジン、 レーアラニルーレーチロシン、アシルネモカルノシン、アセチュ ルカルノ シソ、ヨードカルノシン、ジョードカルノシン、硝酸 アンセリン、カルペノキシロンカルノシン、その幾似体および その組合せからだる群から選ばれることを特徴とする、紫外線 に関すことによる皮よのコラーゲンの架積を被少または防止す
- 9. 活性化合物がカルノシン虫たはホモカルノシンあるいは その組合せである請求の範囲第8項記載の方法。
- 10、 活性化合物がカルノシンである請求の範囲第9項記載の
- 11. 活性化合物がもう1つの分子と結合させられ、数分子は 组成物が皮ふ透透、皮ふ適用および組織吸収に関して改善させ られるようなものである歴末の範囲第8項~第10項のいずれか 1 項に記収の方法。
- 12. 分子がアミノ酸またはペプチドである構求の範囲第14項 記載の方法。
- 13、方法が皮ふへの化合物の局部適用を含む糖求の範囲第8 項~第12項のいずれか.1.項記載の方法。
- 14、組成物がビリルピン、カロテバイド、マンニトール、道 元グルタチオン、セレン、尿酸、ピタミンA、ピタミンC、ピ タミンEおよびその組合せからなる群から選ばれる化合物を含

コラーケンの架構の抑制用化合物および抑制方法 ・ 発明の分野

本発明はひふのコラーゲンの架積および/またはひふ短数 DNAの損傷を減少または防止するための方法に関する。特に 本発明は老化および/または紫外線照射に咽糞に拡に期間のコ ラーゲンの架構を減少または防止する性能を有する特定のジベ プチドおよびその類似体の使用に関する。本発明の方法はまた 紫外線によるDNAの損傷を減少させるためにも適用できる。 発明の登費

活性酸素種による酸化ストレスおよび組織の損傷はかんおよび老化を含む多数の疾患の萎促として示唆されてきた(Balli-wellおよびGutteridge、1985: Harman、1987; Saul等、1987参照)。

非常に反応性のフリーラジカルの環度および生成は染外線によって高められることが知られている。前紀反応性種は後でDNA、RNA、たんぱく質および脂質と反応可能である。前紀反応性種および潜在的に損傷を起す機に対する自然の防御機構が存在することが信じられ、そして老化防止性を持つ多数の分子が組織内に確認されてきた(たとえばピタミン已、カルノンシンおよびアスコルピン酸)。しかしながら、生体内のカルノンシおよびその類似体の生理的な役割は不明のままである。

効率的な一重項酸素値ぞく助であることに加えて、カルノシンに対して示唆された他の役割としては、乳酸の中和(Davey, 1960)、銅キレート網(Brows, 1981)、ミオシン明パンは殴ト

キソイド酵素の活性化因子 (ParkerおよびRiag, 1980) および 酵素の調節剤 (池田等、1980) が挙げられる。

哺乳動物の老化の間じゅう成熟したコラーゲンの架構の量は 増加するが、一方未成熟の波少可能な架構の数は減少する(A■ ez、1983)、他の組織の(たとえば腱)の架構の性質は違いう るが、同様の一般的な傾向が存在する (Ames., 1983: Rattan 等、1982)。さまざまな種に対する架機の量の変化の速度はい ろいろな種に対する寿命の相違を反映すると思われる。たとえ ば、成熟した架橋日日も(ヒスチジノヒドロキシルシノノール ロイシン) の量は40才までヒトのひふで一次的模式で上昇す るが、一方子牛のひふではHHLの量は4才で平坦化する(Ro hea 等、1988)、架揚は、酸化的に脱アミノされるコラーゲン 類中の前駆体リシン (Vizioli 等、1983) またはヒドロキシル リシン (Boldyrev等、1987) から生じる。生成されたアルデヒ ドはその後類似の残分と確合してアルドールを生じるかあるい は隣接するリシンもしくはヒドロキシルリシン残分と複合して シップ系化合物を生じる。コラーゲンの契縛度はまた紫外線に よって増大する。このようにコラーゲンの架構速度とひふおよ じ恐らく他の組織の老化の速度の間には相関がある。

発明の概要

本発明は、、活性化合物と組合せた適切を感形剤を含む組成物で皮みを拍撲することを含んでなり、前記活性化合物がカルメシン、 すそカルノシン、 アンセリン、 3 ーメチルーしーとスチジン、 しーアラニルーしーチロジン、 フシルホモカルノシン、 マエエルトルノシン、 コニビトルノジン・フコードカルノシン、

硝酸アセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体および前記のものの2種以上の混合物から選ばれることを特徴とする、皮よのコラーゲンの架橋および/または皮よ細胞のDNAに対する損傷を減少または防止する方法からなる。

本発明の好ましい実施塾様において、活性化合物は天然に生 じる (たとえばヒトの組織に見出される) カルノシン (p-ア ラニルーレーヒスチジン) のような老化防止化合物である。

目下、活性化合物はカルノシンまたはその組合によるホモカルノシンであることが好ましく、最も好ましくはカルノシンである。

本発明の更に好ましい実施意機において、活性化合物はもう 1 つの分子に結合させられ、その分子は組成物がひふ浸透、ひ ふ適用および組織吸収に関して改良されるようなものである。 この別の分子はアミノ酸まだはペプチドであることが好ましい。

本発明の方法は一般にひふへの組成物の局部通用を含むものであるが、しかしながら、組成物は皮下にもしくは筋肉内に注射でき、または軽口的に飲用できる。組成物中の活性化合物の透度は投与の径路に依存するものであり、内科医の指示で行われるが、しかしながら、活性化合物の濃度はたとえばひふクリーム処方物の最当り1~100歳の短照内であることが予期され、好ましい範囲は3~20歳/ 成である。

本発明の方法は、案外線または日光に**認**らすことによるコラーゲンの架構を被少または防止することによって皮ふの老化を 低下させるものと信じられる。その方法はまた架外線の結果と してのDNA損傷を防止することができるということを生じさ せるので、本発明の方法は皮ふガンの防止に適用可能性を有する。

本発明に係る化合物は、上文で議論した活性ペプチド分子に加えて、コラーゲンの架橋を阻止または防止できる非ペプチド化合物を含みうる。本発明の組成物中に都合よく含みうるそのような化合物としてはビリルビン、カロテノイド、マンニトール、選元グルタミン、セレン、床酸、ビタミンA、ビタミンCおよびビタミンEが挙げられる。

本発明の詳細な記述

本発明の本質をさらに努りょうに理解するために、次にその 好ましい腹根を次の実施例を参照して記述する。

実施例1

マウス皮膚実験

カルノシンのコラーゲン架橋抑制活性の例を表2に示しそしてマウスの皮膚の全選元可能機に対する常外線照射の影響を安1に示した。

L-カルノシンはシグマケミカル社 (Signa Chemical Company)またはBDHケミカル社 (BDH Chemical Ltd.) から入手した。Chromar HPLC等級アセドニトリルをMallintrodt Australia Pty、Ltd.から得て、すべての溶媒を遮遜し使用前に反気した。比放射能50~70キューリー/ミリモルのXB(H²)。をオーストラリア原子力委員会を選して、CEA Franceから購入した。

皮膚線維芽細胞をSwiss マウスから得た組織の原始体外移植 組織から培養した。細胞をDulbeccoの変性Eagles培地 (Gibco)

ラムで35℃の温度および 1.0 mlcc 4.6×30mrミノーSpheri カラム寿命を溶媒管路中にBrownlee 4.6×30mrミノーSpheri 5 プレーカラムガードカートリッジ、およびBrownlee15×32mm Anion Newsyard を使用することによりかなり延ばした。Brownlee カラムはオーストラリアのActivon Scientific Products Co Pty. Lid. により供給された。

勾配系は2種の溶媒から成る。溶媒AはpH4.3、10mHリン酸カリウム緩衝液を含み、そして溶媒Bは水で50:7(マ/マ)に希釈したHPLC一等級アセトニドリルを含んでいた。アミノ酸を先行技術と同様な勾配プログラムを使用することにより分離しうるが、プログラムを選元したコラーゲン成分の分離のために修正した。

中で培養し10%年胎児血液(Gtosystems Pty. Ltd.)を振い第2継代と第3雑代の隔に使用した。皮膚切片もまた新生児Swiss マウスから得た。切片はできるだけ多くの皮下物質を切り取り、次の実験手順の前にリン酸塩級街会塩水で簡単にすすぎ落した。すべての試料を業外線処理に失立ってリン酸塩販街食塩水(PBS)中のLーカルノシンのさまざまな濃度中で1時間37℃でインキュペートした。ホウ水業化物による遠元に先立って、試料をPBS中40℃でよく洗浄し、コラーゲン構造を扱小の筋壊に抑えて汚染されているタンパク質、グリコプロティン、グリコサミノグリカンを除去した。

皮膚切片および皮膚線維芽期胞の閉放風を2 4 ワット殺菌素 外線ランプを使用して9 2 0 W/cmに3時間さらした。試料は 紫外線処理を通して水分を保持した。

18(B²)。による遠元を至温で同種のPBS級衝液中1時間域 四/ホウ水素化物の100:1 濃式重量比で行なった。反応を 4 M酢酸の添加により停止しpHを3.00に下げた。次に試料が可 溶性放射能がなくなるまで蒸留水に対して4 でで透析した。試 料をSeqvenai等級 5 N塩酸中で窒素のもと2 2時間110でで 加水分解した。それぞれの試料をその後蒸留水に溶解させる的 に蒸留水からロータリエバポレーターで2 度乾燥させた。水解 物をHPLCの前に 0.5 N NaOH で中和した。

HPLCをP3500HPLCポンプ、LCC500プログラマーを含んでなるハーマシア (Pharmacia) HPLC/FPLC装置で、加熱カラム室を使用して行なった。

初めての分離をBrowniees 25cm×0.46cmアミノーSpheri5カ

幼若マウスの皮膚の全辺元可能理

麦 工		
組践	爱外娘処理	起 (3R) CPH
皮膚切片	,	
皮膚 (外面)		10000
皮膚(外面)	+	24000
皮膚(内面)	-	[1000
皮膚 (内面)	+	27000
皮斯福園		
線維穿細胞	_	19000
線推芽福路	+	38000

2 mgの試料を通常光線または紫外線で 2.5時間処理し次に KB(B₃)。で還元し、HPLCに先立って加水分解した。

表 2

カルノシンによる雲外線鉄起コラーゲン架機の反転

组版	紫外線処理	カルノシン	#8 (3H) CPM.
皮膚切片	-	_	15000
	+		23000
	+	+	14000
皮膚細胞		_	14000
	+	_	20000
	+	低级量(2mH)	14000
-		高線量(10=2)	10000

は料をカルノシン溶液によって保護しまたは保護なしで表1のように処理した。

支施例 2

皮膚線維芽細胞実験

マウス皮膚線維芽細胞(MDF)の1次培養を新生マウス皮膚から分離し、実験前のわずかも機代にすぎない間ずっと10% 牛胎児血液を加えた高グルコースを持ってDMEM培地中を連続的に通過させた。紫外線露光に先立って、無距層をPBS50 社で洗浄して成長培地のすべての底跡を除去した。MDFを次に10mtカルノシンを加えてまたは加えずに1時間37ででPBS25世とともにインキュベートした。すべての手順を外部光線に対し扱小露光で行なった。

インキュペーション短間の終りに複製細胞集団を繋外線に0、2、4または6分間露光した。照射に続いて凝胞単分子層をはがしPBSを含有する遠心分離管へ移した。遠心分離後上徹を 缺去し、細胞は限物をPBS30起中へ再懸濁した。すべての試料を次いで3日間4でで洗浄した。PBSを毎日2回取り替えた

域料を次にBB[*和。で遠元し酸加水分解した。加水分解溶液をロータリーエパポレーターにかけ、中和してHPLC分析(Swolenski 等、1983 Biochem J.、213、523~532 頁)前に使時乾燥した。 0.5mtのHPLC面分を20mtシンチレーション小瓶中へ直接収集し、Ameraham PCS Inn 能率相化合シンチレート剤5 mtを添加した。計数をLKB 1215 Pack BetaIで行なった。これらの実験結果を第1図~第6図に示す。

マウス皮膚接触を細胞をこすり取ってPBSで洗浄した。分 難した細胞懸痕液を次に記述した方法を使用してHPLCのた

るプロフィルの比較を示す。百分55~75からのピークの減少に より見られるようにカルノシンが紫外級人の影響からMDF報 胞を保護していることがプロフィルのこの重なりから明白であ る。

要的

10mmオルノシンが紫外線Aに露光している間中MDFを授す 溶液中に存在するとき、生成した変化した遠元可能な祭機の生 成に70%の彼少があった。これをHPLCプロフィルの様子に より例示した。すなわち6分間の紫外線A球光+10mmカルノシ ンのプロフィルは2分間紫外線A球光のプロフィルに質似して いた

実施例3

聚外A光級使用ヒト線維芽細胞 (MRC-5) 実験

ヒト肺級維芽級関級関系統 (MRC-5) を紫外A光線に露光したときカルノシンがヒトコラーゲンに与える保護の程度を実践するために使用した。

級維芽細胞は動物の結合組織の維持のための責任がある。それらは積極的に間質空間中へコラーゲンプロペプチドを分泌し、その一部分は結合組織コラーゲンとして細胞外基質中に沈着する。

MDF細胞のために使用したものと同様の実験計画案をこれらの実験において使用したが、紫外線A部光時間を15分間に増加した。これはMDF細胞の6分間紫外線A部光で明白であったコラーゲン保機の変化を増加させるために行なった。これらの開発のはB本著2回。第140以上二十

めに処理した。

第1図に示したプロフィルは典型的な非常外線照射試料(対 图)の指写である。範囲40~90の画分は分離した遠元可能なコ ラーゲン架構から成る。ピーク高さの相違は試料中に存在する 特定な型の架構アミノ酸指体の量の表示である。

第2回に示したプロフィルは繋外A光線に2分間露光後の分離した集構における変化を描いている。再分番号55の主ビークが消失し画分83~87~ピークの位置移動があった。

これらの相違は水分子に対する紫外線の作用により生じたフリーラジカルの相互作用による架構アミノ級塔体の変更を汲わ すものであると推測される。

第3回に示したように繋件A先線に4分間は光後還元可處な 架構のプロフィルは画分55~75の範囲の架構性アミノ酸鍵体の 大きな増加を示した。

第4図に示したように、集外線A番光6分後では百分55~75 に存在する望元可能な架構アミノ酸媒体の含有量に著しい変化 があった。これはたぶん百分55~75における蓄積を引き起こす より少ない境体架構の変更およびことによるとフリーラジカル の相互作用による全く新しい架構の形成の結果である。

第5 図はマウス皮膚線維芽糖酸を10mmカルノシンの存在において6分間染外線Aに露光したときに得られた結果を示した。そこで見られるように第4 図に示したものと比較して分離した保機のプロフィル中に著しい相違があった。

第6回はMDP細胞を2分間紫外線Aにまたは6分間紫外線AのほかにiQenカルノシンの存在下において銭光したとき生ず

第7回では、MDFの集団と同様の報節数でMRC-5の集団をこすり落としHPLCのために処理した。これらの相談は 繋外線Aで処理しなかった。すなわちー対照でありーモのプロフィルはMDF細胞により生じたものと同様であったが相違が あった。主コラーゲン架橋ピークが画分40~90の範囲にあった。

第8図は10m/nカルノシンの存在においてMRC-5細胞を15分間紫外A光線に離光したとき得られたHPLCプロフィルを示す。そのプロフィルは対照(第7図)のプロフィルと周接であってカルノシンがない時の15分間紫外線A露光(第9図)のものと大きな違いであった。

第9図はMRC-5細胞を15分間象外A光線に露光したとき生じたプロフィルを示す。西分40~90の範囲は細胞質のコラーゲン中に新たに生じた架醤増体の推定上の取り込みが広く増加した非線である。

第10包はMRCー5対照から、および10mHカルノシンの存在下において15分間紫外線Aに露光後のMRCー5から分離したHPLCプロフィルの重なりを示す。さらに、2種類のプロフィルの面にはずいぶん類似点がありカルノシンがフリーラジカル攻撃作用からコラーゲンを保護していることを示している。要約

これらの実験からの結果はまたカルノシンが紫外線A誘起架 機に対してコラーゲンを保護するという仮定を支持した。これ はMRC-5対照HPLCプロフィルとカルノシンの存在下に おいて15分間紫外線Aに移光したMRC-5部腔のプロフィル の間の社日ナベキ類は白により示された。また、カルノシン不 在で紫外線A 露光をしたMRC - 5 細胞から得られたプロフィルにおける著しい変化はカルノシンが架構に対するコラーゲンのその保護においてきわめて有効であることを示すものである。 紫外線A 露光時間を 150%増加したこれらの実験は依然として10mMカルノシンで70%より大きい保護を照明した。

<u> 来热例 4</u>

1: 5 -

f. : :

ラット尾歴実験

等尺性融解はコラーゲンの年合関連変化数を決定するために広く使用されてきた(MitchellおよびRigby、1975 BBA、393、531~541 頁)。RobinsおよびBailey(1975 Biochem J. 149、381~385 頁)はコラーゲン架構の密度は時間では一定であるが老化するにつれて生じ、リジンおよびヒドロキシリジンから生成した不安定な望元可能なアリジミン結合が、年令関連コラーゲン変化を説明する熱的に安定で、望元不可能な結合に転換するということを提唱した。

等尺性融解のこの方法はどのように案外線がコラーゲン案橋を変化しうるかを実験するために使用した。多数の他のコラーゲン老化研究 (NitchellおよびRigby、1975 BBA、393、531~541頁; Rigby およびNitchell、1978、BBA、532、65~70頁およびBBA、554、62~68頁; Rigby など、1977、BBRC、79(2)、400~405 貝) のために使用されてきたラット尾腱をこれらの実験において使用した。

この方法はそのまま年令関連架構変化の直接測定基準として 他の方法以上に多くの利点を有す。本出眼は光老化および特に 紫外線によるコラーゲン架構に関連を持っているので、この方

分析のための謎を等尺性装置に取り付け前に3つの様準長さ に再切断した。取り付けた謎を次に20℃のPBS浴中へ浸憶し、 18の張力を適用した。15分間の級和期間後装置の向きを変え て設解が生じるまで1℃/分の初合で温度を上昇した。最終週 定を次にチャーナ記録針から得た。

融架構における測定可能な変化を生じるために必要な露光時間を測定するために、時間経過実験を行なった。この実験の結果を第11因に示す。4本の架外線A質と2本の架外線B管から成る光波を使用する180分間の露光は再生可能な結果を与えたことがわかった。この時間は次の実験のために使用した。

カルノシン、ホモカルノシンおよびアンセリンを複製鍵を放処理するために使用した。これらを次に 180分間常外線ABに 露光した。これらの実験からの結果を第12図に示す。これらの実験においてカルノシンおよびホモカルノシンは10mmおよび 100mm で紫外級線起架機に対して謎を効果的に保護した。一方アンセリン10mmでは全く保護効果が観察されなかったが、アンセリンは高温度で保護効果を与えうることが信じられる。 (あいにくアンセリンは入手可能性の欠除のため高機度での試験はしなかった。)

第13図は他のジペプチドおよびトリペプチドの1セットをカルノシンと比較して紫外線誘起架構に対して腱を保護するための能力を試験したとき得られた結果を示す。試験したぞれらのいずれも紫外線誘起架構に対して腱を保護しないことがわかった。ペプチドの2種類はヒスチジンを含有していたが依然不活性であった。これらの結果はカルノシンがたぶん紫外線誘起コ

注は時間による紫外線架橋の範囲の定置的測定をすることを可能にする。さらに、この方法は紫外線誘起フリーラジカルに対する腱の保護におけるカルノシンおよび他の酸化防止剤の効果を測定することを可能にする。

材料および方法

等尺性融解の技術を光泡化の影響を選定するためにラット尾 腱に適用した。

90日経過Sprague - Dawleyラットをこれらの実験で使用した。 腱の分類

尾を摘出により切除し永漬けにして作業所へ移動した。 繋を次に乾燥を防ぐために生理食塩水で湿らせた外科用パッド上で注意深く解培した。各々の腱をその後選定し半分に切った。 尾の上半分を実験用に使用し一方で下部を物理的対照として 4 でで保存した。

景外線照射および寺尺性測定

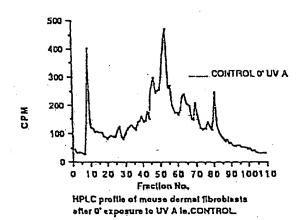
腱の実験用半分を繋外線露光に先立って20時間適切な試験溶液中で4でインキュペートした。この露光に続いて腱をPBSで洗浄し、分析するまで4でで保存した。

ひずみ計一Shinkbo 変換器型式UL~100mm から成る等尺性 装置を増幅器に接続した。ひずみ計に取り付け後試料をPBS を含有するジャケット式パイレックス浴中に浸透した。実験の間じゅうその浴をTamasom循環水加熱器で加熱した。温度上昇を測定するためにFLUKE熱電対型式80TXを襲取り付け位置の際の部分へ取り付けた。力および温度の測定をICI DP 600 2 本ペンチャート記録計で同時に記録した。

ラーゲン保護に対して保護するためにその酸化防止性によって 作用していることを示唆する。

第14図はグルタチオン10mH(10CSH)に対するSm別定に関する第12図からの鍵データとの比較を示す。グルタチオンはこの選定方法を使用するとさらに効果があると思われる。アンセリン(10A)はこの過度では作用しない。グルタチオンはこの適度では生体内でフリーラジカル語ぞく利としての作用に有効ではないものであるということを注目することが重要である。要約

等尺性融解技術を使用するこれらの実験からの結果は、カルノシンが案外線誘起コラーゲン架橋に対してラット尾壁保護に おいて効果的に作用することを決定的に証明した。また試験した他のジベブチドおよびトリベブチドの結果から、カルノシン 効果は明確でありその酸化防止性のために生じることもまた明白である。



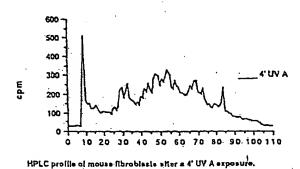
200 200 200 100 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100110 Fraction No.

HPLC profile of mouse dermal fibroblests after 2' exposure to UV A.

Figure1.

1,444





500 60 70 80 80 100 110

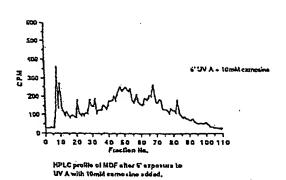
Finction No.

Mouse Dermai Fibroblaste efter 5' exposure

To UV A light (HPLC profile efter sillniks).

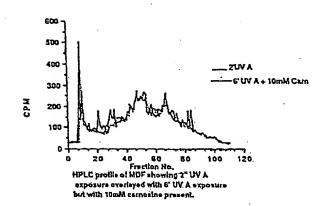
Figure ,3.

Figure,4.



Figure,5.

Ė



Figure, 6.

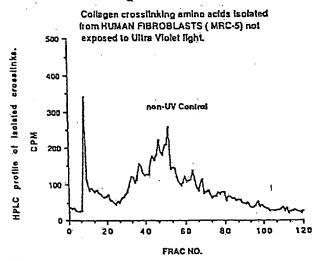
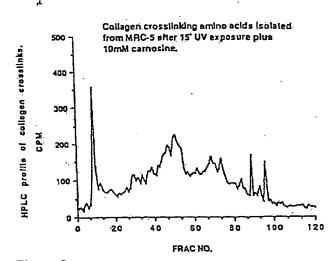


Figure .7.



Figure, 8.

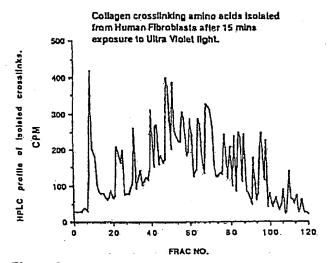
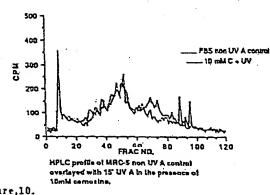


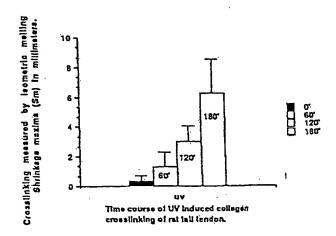
Figure.9.

. 1 :

ĘĖ



Figure, 10.



FIGURE,11.

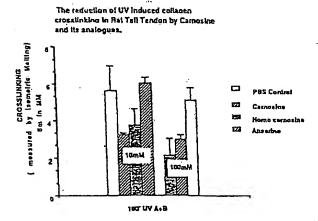


FIGURE 12

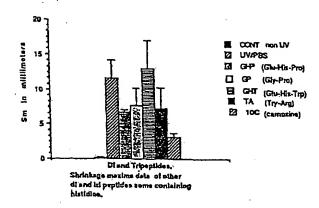


Figure ,13.

FIGURE 14

補正書の翻訳文提出音(特殊) 84条の8の規定による補正書)

平成3年3月28日

特許庁長官 殿

1. 国際出頭番号

PCT/AU 89700422



- 2. 発明の名称 コラーゲンの架構の抑制用化合物および抑制方法
- 3. 特 許 出 願 人 名 称 ペプタイド・テクノロジー・リミテッド (ほか1名)
- 4. 代理 人 住所 〒100 東京都千代田区蔵が図3丁目8番1号

皮の門裏が関ビル14所 栄 光 特 許 事 務 所

氏名 弁理士 (7387). 获 野 平 (ほか3名)

5 補正 書の提出年月日 1990年11月26日



請求の範囲

- 1. 活性化合物と組合せた適切な試形剤を含む組成物で皮みを治療することを含んでなり、 成記話性化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、 3ーメチルーレーヒスチジン、レーアラニルーレーチロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、 項目ではない、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せから選ばれることを特徴とする、皮みのコラーゲンの集場を減少または防止する方法。
- 2. 話性化合物と組合せた適切な試形剤を含む組成物で皮 を治療することを含んでなり、前記話性化合物がカルノシン、 ホモカルノシン、 アンセリン、 3ーメチルーレーヒスチジン、 レーア ラニルーレーチロシン、 アシルホモカルノシン、 アセチルカルノシン、 コードカルノシン、 硝酸アンセリン、 カルベノキシロンカルノシン、 その類似体および その組合せから選ばれることを特徴とする、 皮 ム細胞の DNA に対する損傷を減少または防止する方法。
- 3. 活性化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいは その組合せである請求の範囲第1項または第2項のいずれか1 項に記載の方法。
- 4. 活性化合物がカルノシンである譲求の範囲第3項記載の 方法。
- 5. 活性化合物がもう1つの分子と結合させられ、設分子は 組成物が皮ふ浸透、皮ふ適用および組織吸収に関して改善させ

られるようなものである請求の顧囲第1項一第4項のいずれか 1項に記載の方法。

- 6. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の範囲第5項記載の方法。
- 7. 方法が皮ふへの組成物の局部適用を含む請求の範囲第1 項~第6項のいずれか!項記載の方法。
- 8. 組成物が、ピリルピン、カロテノイド、マンエトール、 遠元グルタチオン、セレン、尿酸、ピタミンA、ピタミンC、 ピタミンEおよびその組合せから遺ばれる化合物を含む錆求の 範囲第1項~第7項のいずれか1項記載の方法。
- 9. 活性化合物と組合せた適切な感形剤を含む組成物で皮みを治歴することを含んでなり、前記活性化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3ーメチルー4ーヒスチジン、レーアラニルーレーチロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、コードカルノシン、は散アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびでの組合せからなる群から選ばれることを特徴とする、紫外線に属すことによる皮みのコラーゲンの架橋を波少または防止する方法。
- 10. 活性化合物と組合せた適切なば形剤を含む組成物で皮ふ を治療することを含んでなり、前記活性化合物がカルノシン、 ホモカルノシン、アンセリン、3ーメチルーLーヒスチジン、 レーアラニルーレーチロシン、アシルカルノシン、アセチルカ ルノシン、ヨードカルノシン、ジョードカルノシン、硝酸アン セリン、カルベノキシカルノシン、その類似体およびその組合

元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンC、ビタミンBおよびその組合せからなる群から進ばれる化合物を含む識求の範囲第9項~第16項のいずれか~項記載の方法。

せからなる群から選ばれることを特徴とする、無外籍に関すことによる皮上の皮上細胞DNAに対する損傷を減少または防止する方法。

- 11. 活性化合物と組合せた透切なは形刻を含む組成物で皮よを治理することを含んでなり、創記活性化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3ーメチルーレーヒスチジン、レーアラェルーレーチロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジョードカルノシン、研設アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およがといるとなっていた。
- 12. 活性化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいは その組合せである請求の範囲第9~第11項のいずれか1項に記 載の方法。
- 13. 活性化合物がカルノシンである請求の範囲第12項記載の方法。
- 14. 活性化合物がもう1つの分子と結合させられ、毎分子は 組成物が皮よ浸透、皮よ適用および組織吸収に関して改善させ られるようなものである請求の範囲第9項~第13項のいずれか 1項記載の方法。
- 15. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の笹囲第14項 記載の方法。
- 16. 方法が皮ふへの化合物の局部適用を含む請求の範囲第9項~第15項のいずれか1項記載の方法。
 - 17. 組成物がピリルピン、カロテノイド、マンニトール、選

回肠周亚银管

国 脉 肾 至 報 2	
becomes tuned augh furtible by. REF/S	
[, CAMELY STATUS OF MARKET MATTER (+) MOON OF CLASSICATION OF STREET, IMPRESES OF	
ALESTONS to Antertweetanni Patter Clumer Feature (1972) of To both document Classification in a lest, Cl. ASM 7/40, 1/40, 1/50, 1/50	me IFC
II. FIELE SHORD	
nuclear percentiation forward f	
Close Line to form tratem Close of Tax by marks	
DEC MAIL 1/44, 37/02	
to the Burnet that such business to the character to the Burnet that such business to the Places described to	
ALL, IPC as above	
III. EXCHANGE CONTINUED TO BE RELEVANT O	
Cotopary" Citation of Department, with Institution, where appropriate, Substant of the retornet pressure 17	
A Occupe Abscruct Accumulation on B1-Eliobki(A3, Class SOA, JP.A., 38-104518 (WCAI E.i., 29 September 1983 (29,00.83)	
A CC.A. 3424781 (SECAI EDISSELECT), 17 Juneary 1985 (17.01.41)	
A CR.A. 2143732 (ROCKE EDISCHOOL 20. Princency 1985 (20.00.45)	
* Special extremetes of alled secondarity IS '1' (year expected modelshed aller too	
"5" themself deliable the present store of the and me melitic with the nooting	
partitionary of partitional and partitional an	
art for decreased but postprouse or after the interest titing cars or claimed forward to account or common value out these densits as selected or or common value or claimed or which is claimed for the claimed for a true forward for the claimed for the claimed forward forw	**
publication drie of angular effection of "1" despend of purposes or comitée	#4# to
'S' decement referring to our old distingue. Inside as possessed with poor or other men. outside the continue with poor or our other	
see, conduct than or other many and	
N. CHIPTOTON	
And of the Arrive Constatous of the State of Sale income	1 10001
14 PCR. PROPER	
Literature 1990 (27 00.90) III. Share at 1740	
Interest principle interest in the state of activities different principles activities different principles activities different principles activities different principles activities acti	

\ ,..

(·

ANNEX TO THE INTERRECTIONAL SEASON REPORT ON PHYSICAL APPLICATION NO. REMAIN 28/10042

This areas lists the brown "A" publication lovel patent inclip subscirulating to the patent documents cited in the above-sentional intermetational search report. The heartmilless Friedrich is in no way liable for these particulars which are sensity given for the purpose of information.

Patent Document:
Clied in Searth
Petent Paully Hamburs
Regart
CR 2143732 Dr 3424997 39 60018926

DED OF MARK

第1頁の続き

動Int.CL*
 識別記号 庁内整理番号
 A 61 K 7/00 ADU H 9051-4C F 9051-4C W 9051-4C 7252-4C C D7 D 233/64 1 0 6 7180-4C

@発明者 ハナン,ガリー・ノエル

⑪出 顕 人 コモンウエルス・サイエンティフィック・アンド・インダストリアル・リサーチ・オーガニゼイション

オーストラリア国 ニュー・サウス・ウエールズ 2111、ボロニア・パーク、アール・ストリート 32 オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2601、キャンプペル、ライムストーン・アヴエニュー (番地なし)